

# Cjepiva protiv tumorskih stanica

---

**Perković, Adrijana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2012**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:624097>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-26**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**CJEPIVA PROTIV TUMORSKIH STANICA**  
**CANCER VACCINES**

**SEMINARSKI RAD**

Adrijana Perkovi

Preddiplomski studij molekularne biologe  
(Undergraduate Study of molecular biology)

Mentor: doc. dr. sc. Inga Marijanovi

Zagreb, 2012.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>2</b>
<b>2. BIOLOGIJA TUMORA.....</b>	<b>3</b>
2.1.KLASIFIKACIJA TUMORA.....	3
2.2. KARAKTERISTIKE TUMORA.....	4
2.3. NASTANAK TUMORA.....	6
<b>3. IMUNOSUPRESIVNI OKOLIŠ TUMORA.....</b>	<b>8</b>
<b>4. IMUNOLOŠKI ODGOVOR NA TUMORE.....</b>	<b>9</b>
<b>5. CJEPIVA U RAZVOJU.....</b>	<b>11</b>
5.1. TERAPEUTSKA CJEPIVA.....	16
5.1.1. TIPOVI TERAPEUTSKIH CJEPIVA.....	16
5.1.1.1. CJEPIVA SASTAVLJENA OD CIJELIH TUMORSKIH STANICA.....	16
5.1.1.2. „HEAT-SHOCK“ PROTEINI.....	17
5.1.1.3 CJEPIVA NA BAZI PEPTIDA.....	17
5.1.1.4. CJEPIVA NA BAZI DENDRITNIH STANICA.....	18
5.2. CJEPIVA ZA PREVENCIJU TUMORA.....	20
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>21</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>22</b>

# 1. UVOD

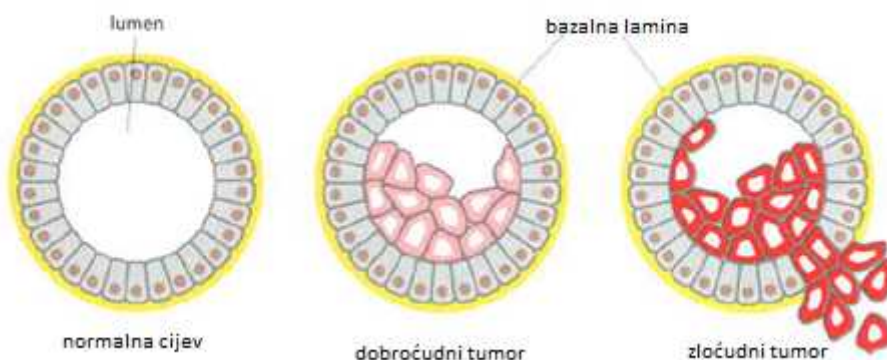
Zanimanje ljudi za tumore datira još iz najranijih vremena. Prvi zapis koji ukazuje na postojanje tumora datira još iz 3000. godine PNE. U staroj Gr koji Hipokrat tako er spominje tumore opisuju i ga sa gr kom rije i *carcinos* (rak). Iz tog doba postoje samo površinske slike raka, pošto se otvaranje tijela protivilo gr koj tradiciji. Tek je u 16. i 17. stolje u za doktore postalo prihvatljivo secirati ljudska tijela da bi se utvrdio uzrok smrti. Veliki pomak u istraživanju tumora zasigurno je bio uzrokovan otkri em mikroskopa u 18. stolje u. Prvi pokušaji kirurškog odstranjenja tumora bila su u ve ini slu ajeva bezuspješni i redovito su završavala smr u zbog loših higijenskih uvjeta. Uvo enjem asepsi nih uvjeta stopa smrtnosti je izrazito pala. Polje onkologije se po elo progresivno razvijati i razvija se još i danas.

Istraživanje tumora izrazito je bitno zato što se procjenjuje da je 1/5 svih smrti uzrokovana upravo tumor<sup>1</sup>. Zbog toga, a i zbog toga što je tumor izrazito zanimljiv i kompleksan sustav, mnoga znanstvena istraživanja danas fokusiraju se na tumore. Prvo se nastojalo klasificirati tumore te istražiti njihovu biologiju te otkriti po emu su to tumori karakteristi ni. Naravno, jako velik interes je pridodan lije enju tumora. Prvi pokušaji lije enja, kao što je navedeno, bili su kirurški. Kirurško odstranjenje tumora usavršeno je i efikasno je kada se radi o dobro udnim tumorima koji su na pristupa nim mjestima, ali ne i kada su u pitanju zlo udni tumori. Da bi se riješio taj problem, znanstvenici su nastojali prona i alternativu kirurgiji za lije enje tumora. Prešlo se na kemoterapiju, koja je u mnogim slu ajevima efikasna, ali je i izrazito agresivna metoda koja ne ubija samo stanice tumora nego i stanice doma ina.

U novije vrijeme pojavila se ideja o razvoju cjepiva protiv tumorskih stanica. Ideja cjepiva je da se ciljano uništavaju tumorske stanice uz minimalnu štetu doma ina i uz minimalne nurspojave. To je dio znanosti koji se razvija velikom brzinom, a daje nam mnogobrojne nove mogu nosti. Pri razvoju cjepiva jako važnu ulogu igra naš imunološki sustav, interakcija tumora s našim imunološkim sustavom te antigeni tumora, tj. kako organizam prepoznaje sam tumor. Prije dizajniranja cjepiva veoma je važno dobro poznavati biologiju samog tumora kako bi se razvio što efikasniji put za suzbijanje tumora.

## 2. BIOLOGIJA TUMORA

Pojmovi tumor i rak često se koriste kao sinonimi, što može u mnogim slučajevima dovesti do krivih zaključaka. Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u tijelu koja može biti dobroćudna ili zloćudna.



Slika 1: Razlika između benignog i malignog tumora (preuzeto iz: Alberts, 2008<sup>1</sup>)

Dobročudni tumor ostaje ograničen na mjesto na kojem je nastao, ne širi se u susjedna normalna tkiva niti u udaljene dijelove tijela. Zloćudni tumor, odnosno rak je skupina bolesti koje karakterizira neregulirani stanični rast. On je u stanju proširiti se na susjedna normalna tkiva i cijelo tijelo preko krvožilnog ili limfnog sustava tvoreći metastaze<sup>2</sup>.

### 2.1. KLASIFIKACIJA TUMORA

Klasifikacija tumora vrši se prema vrsti stanica iz kojih nastaju. Većina ih se može svrstati u jednu od tri glavne skupine: karcinome, sarkome i leukemije ili limfome.<sup>2</sup> Otprilike 85% svih tumora kod ljudi pojavljuju se u epitelnim stanicama, te njih svrstavamo u karcinome<sup>3</sup>. Sarkomi, rijetki u ljudi, solidni su tumori vezivnih tkiva poput mišića, kosti, hrskavica i veziva u užem smislu. Leukemije i limfomi, na koje otpada oko 7% zloćudnih bolesti u ljudi, nastaju iz krvotvornih stanica i iz stanica imunostava. Daljnja klasifikacija temelji se prema tkivu iz kojeg nastaju i vrsti zahvaćenih stanica<sup>2</sup>.

## 2.2. KARAKTERISTIKE TUMORA

Tumori različitog postanka imaju i različita obilježja. Finim analizama, Hallmarks i Weinberg definirali su šest obilježja koje imaju i svih stanica raka.

### 1. Neovisnost o signalima za rast

- normalnim stanicama su za dijeljenje potrebni vanjski signali koji potječu od faktora rasta
- stanice raka nisu ovisne o normalnim faktorima rasta
- mutacije u putevima faktora rasta dovode do nereguliranog rasta

### 2. Tolerantnost na inhibitore rasta

- normalne stanice odgovaraju na inhibitorne signale da bi održale homeostazu (svaka stanica u tijelu ne dijeli se aktivno)
- stanice raka ne reagiraju na inhibitorne signale
- određene mutacije interferiraju sa inhibitornim putevima

### 3. Izbjegavanje apoptoze

- normalne stanice uklanjaju se apoptozom (programirana stanična smrt), esto zbog oštećenja DNA molekule
- stanice raka ne reagiraju na signale koji induciraju apoptozu

### 4. Neograničena množenje

- normalne stanice imaju određeni broj dioba, nakon kojeg se stanice prestaju dijeliti, te nastupa starenje i konačno smrt stanice. Trenutak prestanka dijeljenja određuje se krajevima

kromosoma, tj. dužinom tih krajeva; telomerama. Skraćivanje telomera događa se tijekom svakog replikacijskog ciklusa.

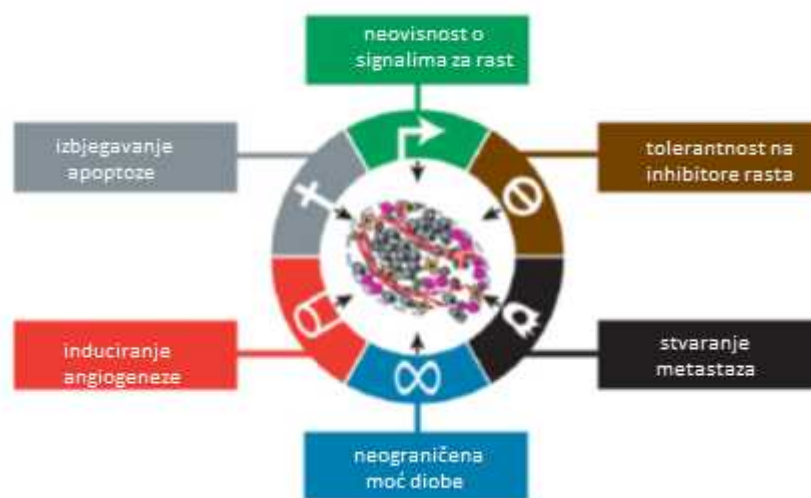
- stanice raka zadržavaju konstantnu dužinu telomera -> to uzrokuje neograničen broj dioba

#### 5. Angiogeneza (formacija novih krvnih žila)

- kisik i nutrijenti do normalnih stanica dolaze krvnim žilama, „arhitektura“ vaskularne mreže je više manje konstantna u odrasloj osobi.
- stanice raka induciraju angiogenezu; rast novih krvnih žila što je potrebno za preživljavanje i ekspanziju tumora
- mijenjaju i ravnotežu između induktora i inhibitora angiogeneze može dovesti do aktivacije iste.

#### 6. Stvaranje metastaza

- normalne stanice zadržavaju svoju poziciju u organizmu; ne migriraju
- jedan od glavnih uzroka smrti uzrokovane rakom leži upravo u migracijama stanica raka u druge dijelove organizma
- mutacije dovode do promjene aktivnosti enzima koji su uključeni u invaziju i mijenjaju molekule koje su zadužene za adheziju između stanica i stanica i ekstracelularnog matriksa<sup>3</sup>.



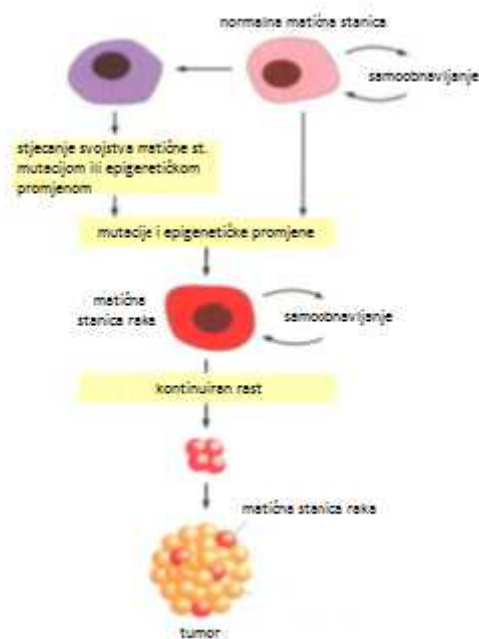
Slika 2: Šest obilježja tumora (preuzeto iz: Hanahan, 2000<sup>4</sup>)

### 2.3. NASTANAK TUMORA

Primarni tumor najčešće nastaje od jedne jedine stanice. Vjeruje se da primarni tumor nastaje diobom stanice koja u sebi nosi neke nasljedne promjene<sup>1</sup>. Induciranjem tumora različitim agensima (karcinogeni) došlo se do zaključka da tumor nastaje zbog alternacija i/ili mutacija u molekuli DNA<sup>3</sup>. Da bi jedna stanica mogla biti ishodište tumora, ona mora mutacije prenijeti na svoje stanice kćeri, tj. mutacije u DNA molekuli moraju biti nasljedne. Važno je pritom napomenuti da do nasljedne aberacije može doći i zbog promjene u samom genetičkom kodu, ali razlog nasljedne aberacije može biti i epigenetički; što podrazumijeva trajne promjene u uzorku genske ekspresije bez promjene u DNA slijedu<sup>1</sup>. Jedna jedina mutacija u molekuli DNA nije dostatna za stvaranje tumorske stanice te mnoge studije pokazuju da je za nastanak tumorske stanice potreban set rijetkih genetičkih mutacija u jednoj stanici<sup>4</sup>. Mutacije se u ljudskim tumorskim stanicama akumuliraju jako velikom brzinom. Ta genetička nestabilnost može rezultirati nemogućnošću u popravku DNA molekule<sup>1</sup>. Mutacije koje dovode do tvorbe tumorskih stanica mogu se događati u somatskim stanicama i u germinativnim stanicama. Mutacije koje su



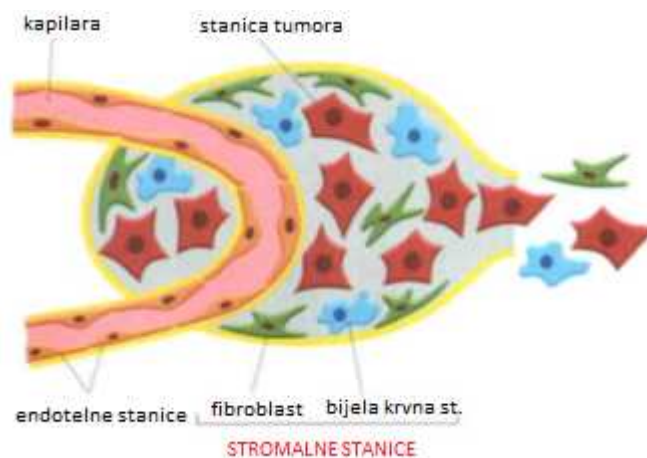
se dogodile u somatskim stanicama ne prosljeuju se na potomstvo, nego zahvaaju samo taj odre eni organizam, a prenose se na stanice keri nakon stani ne diobe. Na potomstvo se prenose samo alternacije koje su se dogodile u DNA molekulama jajne ili spermalne stanice. Rijetko se doga a da takve mutacije dovode neposredno do nastanka raka, ali esto se doga a da takve mutacije pove avaju rizik od dobivanja istog<sup>3</sup>. Jedna od važnih odlika tumora je da se za vrijeme svoje progresije cijelo vrijeme mijenjaju i adaptiraju na okoliš u kojem se nalaze. Pošto stanice tumora izrazito brzo mutiraju, dolazi do nakupljanja geneti kih mutacija koje su onda dobra podloga za selekciju. Zaživjet e one mutacije koje tumorskoj stanici daju prednost nad okolnim stanicama. Tu mnogi znanstvenici vuku analogiju sa Darwinovim konceptom evolucije i to je jedna od teorija nastanka tumora. Druga teorija koja govori o evoluciji tumorskih stanica je teorija matinih stanica. Dva važna svojstva matinih stanica je da se mogu samoobnavljati i da mogu diobom dati stanice keri koje se mogu diferencirati u razli ite tipove stanica. Diobom matine stanice nastaju dvije stanice; matina stanica i diferencirana stanica keri. Mogu nost samoobnavljanja je svojstvo koje matine stanice dijele sa stanicama tumora.



Slika 3: Proces nastanka raka iz matinih stanica (preuzeto iz: Alberts, 2008<sup>1</sup>)

### 3. IMUNOSUPRESIVNI OKOLIŠ TUMORA

Mnogo godina studije koju su se bavile istraživanjem raka fokusirale su se na samu stanicu (tj. stanice raka). Posljednjih godina fokus sa same stanice raka premješta se sa stanice raka na okoliš u kojem se stanice raka nalaze, tj. na njezin mikrookoliš. Normalni mikrookoliš stanice inhibira rast malignih tvorbi, no rastom tumora dolazi do promjena u samom mikrookolišu stanice koje dovode do toga da mikrookoliš tumora sinergisti ki djeluje na proliferaciju tumora<sup>4</sup>. U mikrookoliš stanice raka spadaju normalne stanice i molekule koje okružuju stanice raka. Osnovni tipovi stanica koje nalazimo u mikrookolišu tumorske stanice su epitelne stanice (normalne epitelne stanice, tj. epitelne stanice koje se još nisu transformirale u tumorske), fibroblasti i stanice koje grade krvne žile, stanice ekstracelularnog matriksa, te imunosne stanice. Tako er, u mikrookolišu nalazimo mnoge molekule. Neke od tih molekula spadaju u specijalnu vrstu faktora rasta; kemokini i citokini. Citokini i kemokini su kemijski i celularni aktivatori. Pored citokina i kemokina tu je mnoštvo molekula (npr. kisik) koji imaju sposobnost promijeniti pH okolnog tkiva<sup>5</sup>.



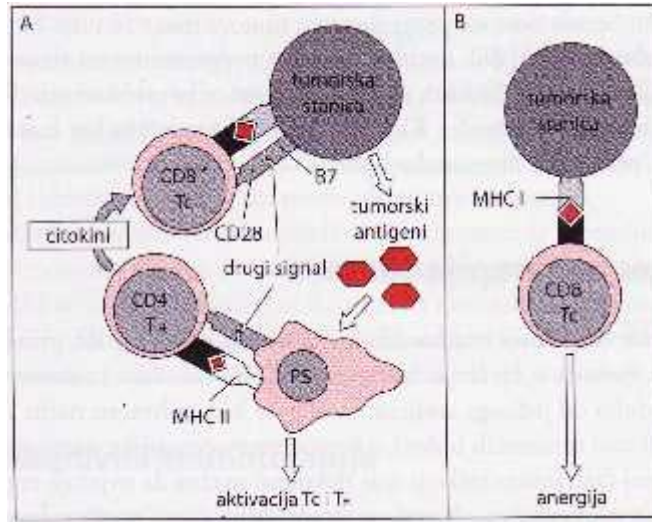
Slika 4: Uloga mikrookoliša u tumorskom rastu (preuzeto iz: Alberts, 2008<sup>1</sup>)

Progresija tumorskog tkiva upravo je potaknuta komunikacijom između tumorskih stanica i stanica mikrookoliša<sup>6</sup>. Stromalne i ostale „normalne“ stanice stvaraju povoljan mikrookoliš za rast tumora, angiogenezu i metastaziranje. Stanice strome igraju najvažniju ulogu; izlazuju tumor-poticanje i tumor supresijske signale. Metabolizam tumora izravno je pogođen nedostatkom krvnih žila što ujedno i znači nedovoljna opskrba kisikom. Nedostatak kisika u tumorskom tkivu dovodi do hipoksije koja rezultira u acidozi (zbog nakupljanja mliječne kiseline koja nastaje kao nusprodukt anaerobne glikolize). Upravo taj acidozni mikrookoliš izrazito smanjuje efikasnost alkalinih kemoterapijskih lijekova. Hipoksični uvjeti dovode do nestabilnosti u genomu što također promovira rast i preživljavanje tumora, te biranje fenotipski agresivnijih stanica.

Interakcije me u stanicama raka i imunskim stanicama doma ina dovode do stvaranja imunosupresivnog okoliša koji dovodi do proliferacije tumora, štiti tumor od mehanizama imunosne obrane i slabi efikasnost imunoterapijskih pristupa. esto dolazi do stvaranja tolerantnosti na tumorsko tkivo, posebno kod tumora koji su uznapredovali. Tumori na razli ite na ine mogu suprimirati imunski sustav lu enjem citokina, mijenjanjem antigen prezentiraju ih stanica te kostimulatornih i koinhibitornih molekula<sup>7</sup>.

## 4. IMUNOLOŠKI ODGOVOR NA TUMORE

Upravo su citotoksi ni limfociti T glavni efektori anti-tumorskog odgovora. Imaju sposobnost izravnim dodirrom uništiti tumorsku stanicu. Limfociti T nikad ne prepoznaju tu i antigen (tumorski u ovom slu aju) izolirano nego samo spregnuto, u kompleksu s molekulama MHC-I vlastitog organizma. Nažalost, brojni tumori slabo izražavaju MHC-I pa to ograni ava ulogu citotoksi nih limfocita i omogu uje tumoru da nezamije eno izmakne imunskom nadzoru. Prepoznavanje se vrši pomo u receptora limfocita T (TCR receptor). Za aktivaciju limfocita T potrebna su dva signala, prvi (specifi ni) signal- dodir receptora limfocita T s kompleksom dvaju molekula (MHC+prera eni tu i peptid) na predo noj stanici te drugi kostimulacijski signal. Stanice koje predo uju antigen (antigen prezentiraju e stanice) imaju zada u da na svojoj membrani izlože antigen i time omogu e njihovo prepoznavanje pomo u limfocita T. Tri su glavne skupine profesionalnih predo nih stanica; dendriti ne stanice, makrofagi i limfociti B. Predo ne stanice imunskog sustava imaju ulogu da prerade antigen, a tek onda njegove dijelove, koje nazivamo antigenskim determinantama, izlože na svojoj membrani, gdje ih prepoznaju limfociti T. Jedne od glavnih predo nih stanica u imunskom odgovoru na tumor su dendriti ke stanice<sup>3</sup>. Dendriti ke stanice nalaze se primarno u koži. Dijelimo ih na: Langerhansove stanice, intersticijske dendriti ne stanice, dendriti ne stanice monocitnog podrijetla, plazmocitoidne dendriti ne stanice i konvencionalne dendriti ne stanice<sup>2</sup>. Endocitoza je primarni na in uzimanja antigena od strane dendriti nih stanica. Prera eni antigen se izloži na membrani zajedno u kompleksu s molekulama MHC koje se tako er nalaze na membrani predo ne stanice. Važnost MHC molekula je u tome što organizam prepoznaje antigen jedino ako je on predo en u sklopu vlastitih MHC molekula. MHC molekule dijele se u dvije podskupine, MHCI i MHCII. Tako er, predo ne stanice pružaju i kostimulacijski signal nužan za aktivaciju limfocita T. Upravo bi nedostatak kostimulatora ili molekula MHC-II koji su potrebni za aktivaciju limfocita T mogao biti još jedan od uzroka izbjegavanja imunoreakcije. Drugi dodatni signal daje interakcija CD80 (B7) na predo noj stanici i molekule CD28 na limfocitu T. Oba su signala potrebna da potaknu proizvodnju IL-2 i proliferaciju limfocita T. Uslijed nedostataka drugog signala dolazi do anergije citotoksi nih limfocita T<sup>2</sup>.

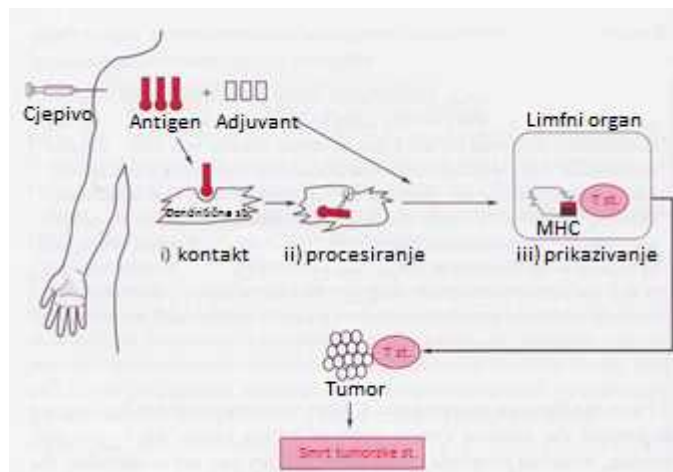


Slika 5: Predo avanje tumorskih antigena limfocitima. (preuzeto iz: Andreis, 2010<sup>2</sup>)

Dobro poznavanje imunološkog odgovora na tumorske antigene važan je u efektivnoj borbi protiv tumora. Tek kada se dobio uvid u tu složenu imunosnu reakciju moglo se krenuti u dizajniranje cjepiva kako bi se suzbile tumorske stanice. Pri tome se velika važnost treba posvetiti MHC molekulama, antigenima te kostimulacijskim molekulama. Upravo su se kostimulacijske molekule pokazale jako važnima u induciranju odgovora protiv tumora prilikom upotrebe cjepiva.

## 5. CJEPIVA U RAZVOJU

Ideja o cjepivima protiv tumorskih stanica pojavila se upravo tijekom prou avanja imunosnog odgovora na tumore<sup>8</sup>. Kroz ljudsku povijest imamo primjere raznih bolesti koje su esto bile uzrok masovnih izumiranja, te su primjenom cjepiva skoro pa potpuno eliminirane. Primijeno je da naš imunološki sustav primje uje i uništava tumorske stanice. U biti, tumorske stanice u našem tijelu nastaju na svakodnevnoj bazi. Upravo je imunološki sustav taj koji detektira promijenjene stanice te ih lizira. Tek kada naš imunološki sustav „zakaže“ može do i do nastanka tumora. Novije studije su pokazale da efektorne stanice imunološkog sustava mogu prepoznati antigene tumorskih stanice te ih potom eliminirati. Upravo to svojstvo imunološkog sustava ukazuje na to da je senzibilizacija na tumorske stanice pomo u vakcina mogu a.<sup>9</sup>

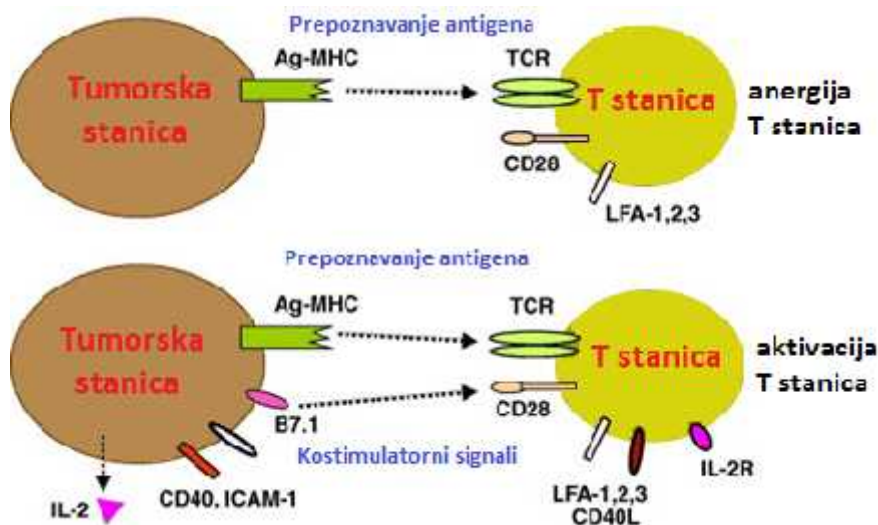


Slika 6: Događaji u stanici nakon vakcinacije (preuzeto iz: Pecorino, 2008<sup>3</sup>)

Prilikom dizajniranja cjepiva protiv tumorskih stanica posebno je važno obratiti pažnju na to koji antigen i koji adjuvant koristiti, koji tip imunskog odgovora izazivamo i kako da ga učinimo dugotrajnim.

Prvi korak u proizvodnji cjepiva je odabir pogodnog antigena koji će uspješno stimulirati efektivni anti-tumorski odgovor<sup>8</sup>. Antigeni se dobivaju degradacijom odmotanih intracelularnih proteina koji su prebačeni do površine tumorske stanice. Također, antigene možemo dobiti i od oštećenih ili umirućih tumorskih stanica. Prvi tipovi tumorskih cjepiva bila su sastavljena od ožračenih tumorskih stanica. Ovaj tip cjepiva napravljen je po uzoru na cjepiva protiv virusa i bakterija i virusa koja su se u ovom obliku pokazala vrlo uspješnima. Pošto su u cjepivu prisutne cijele stanice, samo znatno oslabljene, logičan zaključak je da cjepivo sadrži sve antigene koje nalazimo na određenoj tumorskoj stanici. Kao što je već prije navedeno, glavne izvršne stanice koje prepoznaju tumorske antigene i onda aktiviraju izvršne mehanizme imunološkog sustava su limfociti T. Antigeni koji se nalaze u vakcini moraju se na neki način predložiti limfocitima T. To se postiže vezanjem antigena na površinu predložne stanice<sup>3</sup>.

Za efektivnu aktivaciju T-limfocita potrebna su dva signala. Prvi preko TCR receptora, te drugi kostimulatorni. To je dovelo do upotrebe cjepiva koja su bila sastavljena od stanica tumora koje su prethodno genetički modificirane kako bi se povećala ekspresija raznih kostimulatornih molekula i/ili citokina. Iako su ovakva cjepiva dala zadovoljavajuće rezultate kod primjene na mišjim modelima u daljnjim kliničkim istraživanjima su zakazala<sup>8</sup>. Imunosni odgovor koji se dobije ovakvim cijepljenjem je vrlo slab, a često je ovakvim cijepljenjem došlo i do razvoja autoimunosti<sup>3</sup>. Razvoj autoimunosti nije samo hipotetski; do pojave autoimunosti došlo je tijekom ispitivanja kako na animalnim modelima tako i prilikom kliničkih istraživanja. Usprkos svemu, upotreba cijelih tumorskih stanica ima jednu jako veliku prednost u odnosu na ostale oblike terapije a to je specifičnost<sup>8</sup>.



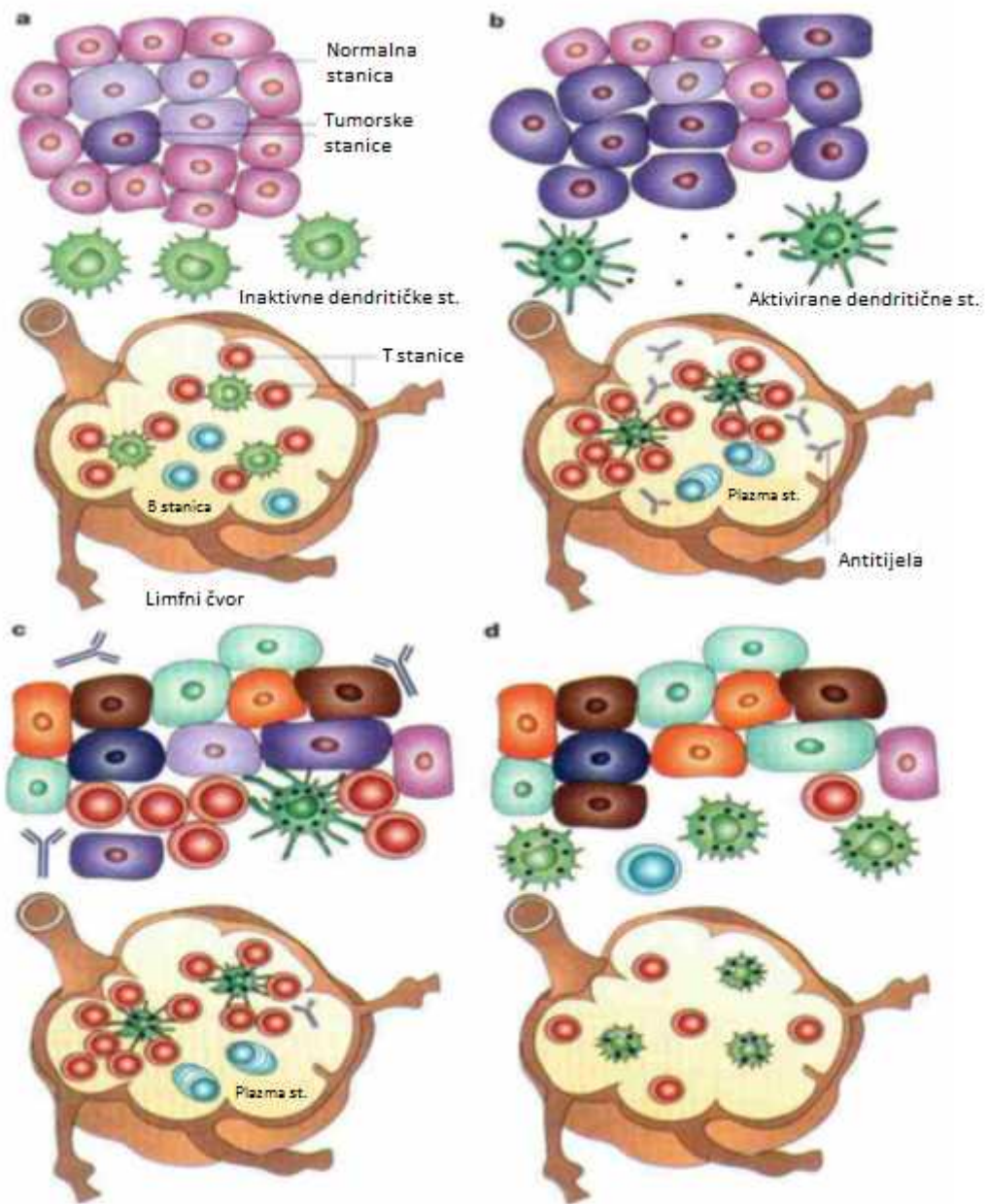
Slika 7: Prepoznavanje tumorske stanice (preuzeto iz: Joseph, 2002<sup>10</sup>)

Prilikom dizajniranja cjepiva mora se odabrati pravi adjuvant. Adjuvanti su ključne komponente svih anti-tumorskih cjepiva, neovisno o kojem tipu cjepiva se radi<sup>11</sup>. Adjuvanti mogu aktivirati antigen predodane stanice. Tako aktivirane predodane stanice u inkubaciji stimuliraju T-limfocite, aktiviraju NK stanice, te potiču na izlučivanje citokina i omogućavaju preživljavanje antigen-specifičnih T-limfocita. Dugo vremena su se kao adjuvanti koristili citokini (kao npr. IL-2), GM-CSF, IL-12, IL-14 i mnogi drugi. Kao adjuvant se dugo koristio i lipopolisaharid (LPS) iz gram-negativnih bakterija. Iako su adjuvanti iznimno značajan sastojak anti-tumorskih cjepiva, na svjetskoj razini samo su dva adjuvanta odobrena za klinička istraživanja; aluminij bazirane soli (alum) i MF59<sup>8</sup>.

Izrazito je bitno i paziti na to koji tip imunološkog odgovora se izaziva. Kod tumora koji metastaziraju potrebno je izazvati sistematičnu imunost i većina razvijenih cjepiva do sada bila je usmjerena na izazivanje sistematične imunosti<sup>11</sup>. Tijekom godina istraživanja primijećeno je da mnogi tumori (primarni tumori) imaju izvorište na mukoznim stanicama i membranama te prvi kontakt ostvaruju s mukoznim imunim sustavom. Sve se više radi na proizvodnji cjepiva koja bi potaknula kako sistematičnu tako i mukoznu imunost. Zadaća mukoznog imunološkog sustava je brza eliminacija patogena, a da pritom ne reagira na antigene iz hrane i na normalnu bakterijsku floru. Prilikom upotrebe cjepiva koje utječu na mukozne stanice potrebno je paziti da se ne poremeti ta fina ravnoteža a istovremeno je potrebno pojačati imunski odgovor protiv patogena<sup>12</sup>.

Također, jedan od važnih mehanizama obrane protiv tumorskih stanica kojemu se u posljednje vrijeme posvećuje sve više pažnje je imunološka memorija koje neka cjepiva potiču a neka ne. Ovo je relativno novo područje istraživanja. Problem se javlja prilikom razdvajanja memorijskih T stanica od ostalih T stanica zbog malog broja specifičnih markera. Kemokinski receptori su se pokazali zasada najefektivnijima u razdvajanju T stanica na subpopulacije. Danas se zna da je za nastanak memorijskih stanica potrebna jaka primarna imunološka reakcija, no

znanstvenici još uvijek nisu sigurni što utječe na dugovječnost memorijskih stanica. Štoviše, nije jasno da li je uopće moguće stvaranje dugoročne pamćenja za kronične bolesti kao što je tumor<sup>8</sup>.



Slika 8: Odgovor tumora na imunski sustav (preuzeto iz: Finn, 2003<sup>8</sup>)

## 5.1. TERAPEUTSKA CJEPIVA

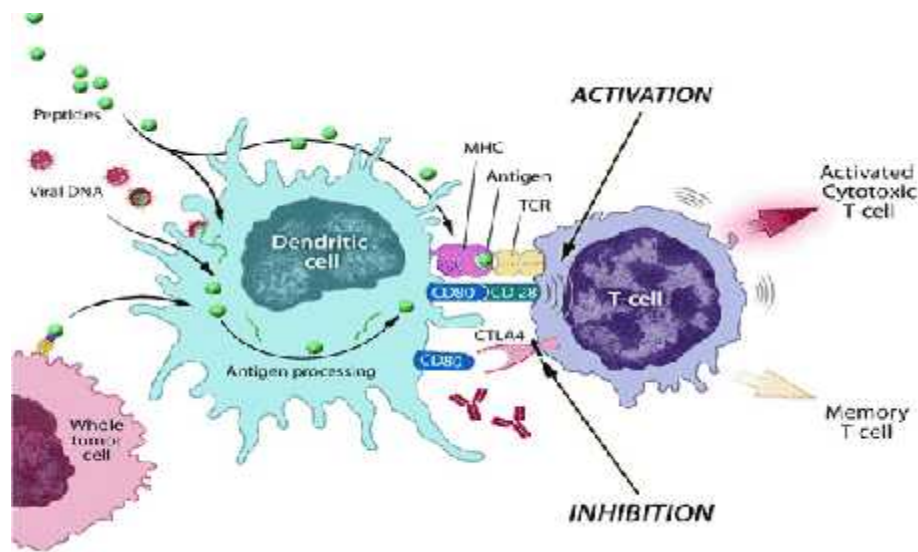


Terapeutska cjepiva predložena su kao terapija koja je potaknuti antitumorski imunitet u pacijentima te dovesti do prolongiranja ponovnog pojavljivanja bolesti<sup>13</sup>. Naime, mnogi primarni tumori se mogu odstraniti kirurški, te je esto dug period prije nego što se tumor opet pojavi na metastaziraju im mjestima. Klinička istraživanja s terapeutskim cjepivima protiv tumorskih stanica uglavnom se provode na osobama poodmakle dobi (65-80 godina) dok se gotova sva predklinička istraživanja izvode na mladim miševima. To može predstavljati problem jer me u T-limfocitima koji reagiraju na cjepivo može, ali i ne mora nužno biti odgovaraju ih T-limfocita. Naime, timus ve za vrijeme puberteta prestane razvijati naivne T-limfocite. Kod mišjih modela je jasno pokazano da je primarni imuni odgovor u mladim miševima puno ja i nego u starim miševima. Vrlo malo predkliničkih studija koristi stare miševe, a oni koji koriste, pokazali su poteško e kod induciranja efektivnog antitumorskog imunogenog odgovora kod starijih miševa. Upravo zbog toga sve se više posve uje pažnja razvoju cjepiva koji bi riješili neke od tih problema<sup>8</sup>. U svrhu poboljšanja cjepiva dodaju se razne molekule koje djeluju kao kostimulatorne. Primijetilo se tako er da CpG-DNA izrazito potiče humoralnu i stani nu imunost<sup>11</sup>.

## **5.1.1. TIPOVI TERAPEUTSKIH CJEPIVA**

### **5.1.1.1. CJEPIVA SASTAVLJENA OD CIJELIH TUMORSKIH STANICA**

Prvi tipovi tumorskih cjepiva. Sastavljena su od ozračenih tumorskih stanica. Najve u primjenu našli su u lije enju melanoma. Terapeutska cjepiva protiv melanoma sastavljena su od lizata alogeni nih tumorskih linija u kombinaciji s adjuvantom<sup>8</sup>. Jedno od poznatih i odobrenih cjepiva je "Melacin". Pokazao je određene pozitivne efekte u kliničkim istraživanjima s pacijentima koji su imali poodmakli stadij melanoma. U 10-20% primijenjeno je smanjenje metastaziranja te u drugih 10-20% tumor je stabiliziran. Cjepivo je odobreno u Kanadi i SAD-u<sup>12</sup>. "Canvaxin" je još jedno cjepivo razvijeno protiv melanoma koje spada u ovu skupinu te je testirano na pacijentima s poodmaklim stadijem melanoma. Rezultati kliničkog istraživanja pokazali su mali, ali statistički zna ajan postotak preživljenja tijekom primjene cjepiva<sup>11</sup>.



Slika 9: Primjena cijelih tumorskih stanica u terapijske svrhe

preuzeto sa: [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)

#### 5.1.1.2. HEAT-SHOCK PROTEINI

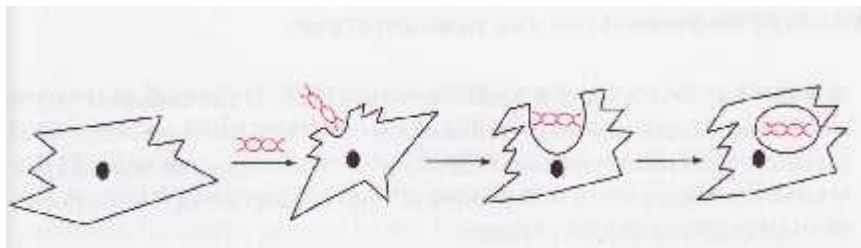
Primijeno je da se za vakcinizaciju mogu upotrijebiti heat-shock proteini koji vežu tumorske antigene. Oni se izoliraju iz "svježih" tumora. U kliničkim istraživanjima koristio se Hsp gp96<sup>12</sup>.

#### 5.1.1.3. CJEPIVA NA BAZI PEPTIDE

Ova cjepiva se baziraju na peptidima koji se nalaze na površini tumorske stanice. Identificiraju se specifične molekule sa površine tumorske stanice koje prepoznaju limfociti T<sup>14</sup>. Mnogi antigeni na površini tumorske stanice izazivaju imunski odgovor i bez pojave autoimunosti. Pronalaze se takvi antigeni te se umnaža kratka aminokiselinska sekvenca koja kodira za antigenski dio (dio koji se prepoznaje). Glavni problem kod ove vrste cjepiva je identifikacija tih antigena. No, u novije vrijeme uspješno su dobivena mnoga cjepiva protiv tumorskih stanica. Cjepiva na bazi peptide primjenjuju se u liječenju raka dojke i u nekim vrstama melanoma<sup>15</sup>.

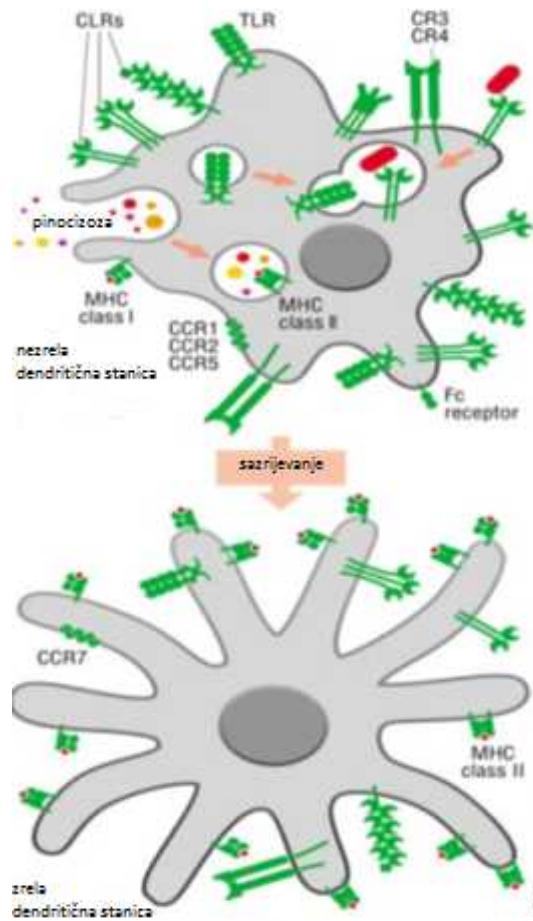
#### 5.1.1.4. CJEPIVA NA BAZI DENDRITNIH STANICA

Vrsta cjepiva koja sadrži ljudske dendritičke stanice. Dendritičke stanice su antigen prezentirajuće stanice sa svojom sposobnošću unosnja i procesiranja antigena u tkivima i perifernoj krvi<sup>13</sup>. Dokazano je da *in vivo* tumorske stanice oslobađaju određene faktore koje dovode do inhibicije proliferacije i migracije dendritičkih stanica. Glavni problem je što dendritičke stanice nemaju dovoljno u optjecaju, što kombinirano sa inhibitorima izlazećim od strane tumorskih stanica dovodi do stvaranja “rupe” u imunološkom sustavu. Dendritičke stanice se izoliraju iz pacijenta i kultiviraju se *in vitro* prilikom čega se zahvaljujući i mogu nastati endocitoze, „punjenje“ antigenima, DNA ili RNA<sup>3</sup>. Kultiviranje *in vitro* omogućilo je otkriće da se mijeloidne dendritičke stanice mogu lako proizvesti koristeći monocite ili CD34<sup>+</sup> prekursora<sup>13</sup>.



Slika 10: „Punjenje dendritičkih stanica“ (preuzeto iz: Pecorino, 2008<sup>3</sup>)

Tako pripremljene dendritičke stanice vraćaju se u organizam pacijenta gdje aktiviraju proizvodnju citotoksičnih limfocita T. Problem takvih cjepiva je izrazito visoka cijena. Rezultati liječenja terapijskim cjepivima su jako dobri, sa zadovoljavajućim imunosnim bez značajnih nuspojava poput autoimunosti. U znanstvenim krugovima postavlja se pitanje da li postoji razlika između primjene zrelih i nezrelih dendritičkih stanica. Tijekom sazrijevanja dendritičke stanice razvijaju ogranke, dendrite. Dendritičke stanice u krvi se nalaze u nezrelom obliku, a stupanje u dodir s antigenom te upalni signali potiču njihovo sazrijevanje. Iako mehanizam djelovanja još nije u potpunosti jasan, postoje indikacije velikoj razlici između zrelih i nezrelih dendritičkih stanica. Stupanj zrelosti dendritičkih stanica mogao bi biti jako važan faktor u efikasnosti imunoterapije<sup>3</sup>.



Slika 11: Razlika između u diferenciranih i nediferenciranih dendritičnih stanica (preuzeto iz Pecorino, 2008<sup>3</sup>)

## PROVENGE

Jedan od primjera odobrenih cjepiva koje je sastavljeno od dendritičnih stanica je „Provenge“. Koristi se u terapiji za liječenje raka prostate. Za proizvodnju je potrebno prvo izolirati frakciju bogu preursorima dendritičnih stanica. Potom stanice sazrijevaju *in vitro* inkubacijom sa rekombinantnim fuzijskim proteinom (on se sastoji od kisele fosfataze iz prostate koja je povezana sa faktorom za stimulaciju granulocitnih-makrofagnih kolonija, GM-CSF) koji se veže na GM-CSF receptor na dendritičnim stanicama. Tako dobivene dendritične stanice

sadrže vezan tumorski antigen te se vraćaju u organizam<sup>3</sup>. Provenge je odobren 29.04.2010., te se primjenjuje na pacijentima koji imaju podmakli stadij raka prostate i kod kojih hormonska terapija nema utjecaja. Produljuje život za oko 4 mjeseca pacijentima u terminalnom stadiju<sup>16</sup>.

## **5.2. CJEPIVA ZA PREVENCIJU TUMORA**

Neke vrste tumora uzrokovane su bakterijama ili virusima (patogeni karcinogeni). U takvim slučajevima moguće je sintetizirati cjepiva koja ne moraju biti usmjerena protiv samog tumora, nego protiv patogena koji uzrokuje tumor. Jedan od dobrih primjera je HPV (humani papilloma virus). Infekcija tim virusom može uzrokovati pojavu cervikalnog raka maternice<sup>3</sup>. Ta vrsta raka 100% je uzrokovana virusom i do sada nije nađen niti jedan uzročnik, osim virusnog, koji dovodi do nastanka tog tipa raka.

U 2007. odobreno je cjepivo za prevenciju infekcije HPV-om. Dva cjepiva koja su danas dostupna na tržištu su „Cervarix“ i „Gardsil“. Važno je pritom napomenuti da razvijena cjepiva ne štite od HPV-a u potpunosti, oni štite od nekih specija HPV-a (štite od virusa najvišeg rizika).<sup>17</sup> Razvijaju se i cjepiva koja bi trebala spriječiti rak dojke. Ta cjepiva su trenutno u prvoj ili drugoj fazi kliničkih istraživanja, ali proći će još dosta vremena prije nego što takvo cjepivo bude komercijalno dostupno<sup>3</sup>.

## **5. ZAKLJUČAK:**

Napredak u istraživanju tumora u posljednjih nekoliko desetljeća zaista je zadivljujući. Dobili smo uvid u jedan cijeli novi svijet. Razvijena su već neka cjepiva koja su odobrena i u uporabi su, a mnoga čekaju odobrenje. Jedan problem kod cjepiva protiv tumorskih stanica je njihova jako visoka cijena. Također, jako je važno u kojem će smjeru dalje ići razvoj cjepiva; da li će se razvoj i istraživanje više fokusirati na terapijska ili na preventivna cjepiva. Nastoje se razviti što bolje metode za efikasnu izolaciju tumorskih antigena. Veliki problem kod primjene cjepiva, tj. kod tumora općenito, je činjenica da je tumor brzo adaptiran na sustav. To je vrlo velik problem te se na njegovom rješavanju još uvijek radi. Upravo zbog svoje kompleksnosti upitno je da li će tumor ikada moći biti efikasno izliječen.

## **6. LITERATURA:**

- 1 Alberts, B., Wilson, J. H. & Hunt, T. *Molecular biology of the cell*. 5th edn, (Garland Science, 2008).
- 2 Igor Andreis, D. B., Filip Čulo, Danka Grčević, Matko Marušić, Milan Taradi, Dora Višnjić. *Imunologija*. (2010).
- 3 Pecorino, L. *Molecular biology of cancer : mechanisms, targets, and therapeutics*. 2nd edn, (Oxford University Press, 2008).
- 4 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 5 Bianchi, G., Borgonovo, G., Pistoia, V. & Raffaghello, L. Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells. *Histology and histopathology* **26**, 941-951 (2011).
- 7 de Souza, A. P. & Bonorino, C. Tumor immunosuppressive environment: effects on tumor-specific and nontumor antigen immune responses. *Expert review of anticancer therapy* **9**, 1317-1332, doi:10.1586/era.09.88 (2009).
- 8 Finn, O. J. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nature reviews. Immunology* **3**, 630-641, doi:10.1038/nri1150 (2003).
- 10 Joseph, A. *et al.* Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parenteral and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines. *Vaccine* **20**, 3342-3354 (2002).
- 11 Lollini, P. L., Cavallo, F., Nanni, P. & Forni, G. Vaccines for tumour prevention. *Nature reviews. Cancer* **6**, 204-216, doi:10.1038/nrc1815 (2006).
- 12 Antonia, S., Mule, J. J. & Weber, J. S. Current developments of immunotherapy in the clinic. *Current opinion in immunology* **16**, 130-136, doi:10.1016/j.coi.2004.01.012 (2004).
- 13 Figdor, C. G., de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J. & Melief, C. J. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature medicine* **10**, 475-480, doi:10.1038/nm1039 (2004).
- 14 Machiels, J. P., van Baren, N. & Marchand, M. Peptide-based cancer vaccines. *Seminars in oncology* **29**, 494-502 (2002).
- 15 Jackson, D. C., Purcell, A. W., Fitzmaurice, C. J., Zeng, W. & Hart, D. N. The central role played by peptides in the immune response and the design of peptide-based vaccines against infectious diseases and cancer. *Current drug targets* **3**, 175-196 (2002).

#### INTERNET:

<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/cancer-vaccines>

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/ucm210215.htm>

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/learning-center/biofiles/biofiles-4-7/angiogenesis/tumor-microenvironment.html>

#### SAŽETAK:

Tumori su područje izrazitog interesa za znanstvenike. Zbog svoje kompleksnosti jako je teško naći i neko efektivno cjepivo. Novim pristupom tumorima znanstvenici su sve bliže rješenju. Fokus se premješta sa same tumorske stanice na mikrookoliš tumora te na njegovo djelovanje na okolne stanice; stanice organizma na koje tumor djeluje. Tijekom istraživanja koja obuhvaćaju tumore znanstvenici često nailaze na mnoge probleme. Možda najveći problem leži u tome što je tumor izrazito brzo adaptiraju i te je zbog toga jako teško naći i efektivno i trajno rješenje protiv njega. No uspjesi su svakako zabilježeni razvojem novih terapijskih i u novije vrijeme preventivnih cjepiva. Ipak, moramo biti svjesni da i u najboljim uvjetima sa idealnim cjepivom uspjeh cjepiva ovisi o sposobnosti imunološkog sustava da prevlada imunosupresiju induciranu tumorom, samom terapijom ili starosti samog organizma.

Ovaj rad dao je kratak pregled općih svojstava tumora, njegovog mikrookoliša i djelovanja tumora na okolne stanice, te razvoja novih terapija za liječenje tumora.